

*Бриллиант С.А.^{1, 2}, Юшков Б.Г.^{1, 2, 3},
Тюменцева Н.В.^{1, 2}*

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОДНОРОДНОСТИ ГЕМОГЛОБИНОВОГО ПРОФИЛЯ КОСТНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ИНИЦИИРОВАНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

¹ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

г. Екатеринбург, Российская Федерация

² Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,

г. Екатеринбург, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский
университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Изменение гемоглобинового профиля периферической крови при экстремальных воздействиях на организм взаимосвязано с изменением соотношения между отдельными популяциями эритроцитов, различающихся по содержанию отдельных изоформ. Однако, сдвиги в соотношении изоформ костного мозга при развитии воспалительной реакции остаются мало изученными. **Цель работы:** исследовать неоднородность гемоглобинового профиля костного мозга крыс после инициирования воспалительного процесса. **Материалы и методы исследования.** Эксперименты проводили на 50 крысах линии Вистар. Острое асептическое воспаление вызывали путем введения под кожу спины скипидара в количестве 0,5 мл. Животных делили на следующие группы: 1 группа — контрольная. 2 — 4 группам инициировали острое асептическое воспаление на сроки — 6 ч, 2 и 4 сут единообразно. Проводили оценку следующих показателей: миелограмма, общий анализ крови, содержание ретикулоцитов и содержание эритроцитов с фетальными формами гемоглобина, соотношения белковых фракций гемоглобина костного мозга и периферической крови. **Результаты.** После инициирования воспалительного процесса на 6 ч в миелограмме у крыс отмечается увеличение общего числа эритробластов, миелоцитов, ретикулярных клеток и мегакариоцитов. Возрастание числа эритробластов с увеличением числа ретикулярных клеток свидетельствует об активации эритропоэза на 6 ч после введения скипидара. На 2 сут после развития воспалительной реакции, число эритробластов и миелобластов значительно снижается, в сравнении с интактной группой. На 4 сут отмечается увеличение общего числа миелокариоцитов за счет увеличения клеток всех типов нейтрофильного и лимфоидного рядов. Наблюдается снижение эритробластов и мегакариоцитов по сравнению с контролем. После введения скипидара на 6 ч в гемоглобиновый про-

филь костного мозга характеризуется снижением доли гемоглобинов 1 и 2 белковых фракций, за счёт увеличения содержания гемоглобинов 3 и 6 изоформ. На 2 сут после острого асептического воспаления уровень 5 и 6 белковых фракций гемоглобина возрастает за счет снижения гемоглобина 1, 2 и 3 белковых фракций. На 4 сут после инициирования воспалительной реакции отмечается падение 2, 3 изоформ за счет роста – 4 и 5 белковых фракций. Заключение. Гемоглобиновый профиль костного мозга характеризуется возрастанием фракций с кислотоустойчивыми свойствами, что способствует наибольшему притоку не только нейтрофильных, но и эритроидных клеток в очаг воспаления.

Ключевые слова: гемоглобин, костный мозг, воспаление

Введение

Воспаление является наиболее частой формой типового патологического процесса, который развивается в результате воздействия на организм повреждающего фактора. В настоящее время считается, что воспаление — это сложная, выработанная в процессе эволюции, нейро-сосудисто-тканевая реакция организма в васкуляризованных органах (тканях) в ответ на местное действие повреждающего фактора, направленная на нейтрализацию повреждающего агента и на восстановление поврежденной ткани [1].

Известно, что система крови является основной эффекторной системой воспаления. Реакции системы крови при воспалении включают эмиграцию лейкоцитов из крови в очаг, поступление лейкоцитов из костномозгового резервного пула в кровь, активацию кроветворения и, соответственно, транзиторную лейкопению и лейкоцитоз [2, 3, 4]. Изменения в периферической крови служат в клинике основным критерием распространенности, течения, этапа воспаления, эффективности противовоспалительных средств и соответствующей терапии [5].

В настоящее время известно, что изменение гемоглобинового профиля периферической крови при экстремальных воздействиях на организм взаимосвязано с изменением соотношения между отдельными популяциями эритроцитов, различающихся по содержанию отдельных изоформ [6, 7]. Однако, изменения соотношения изоформ костного мозга при развитии воспалительной реакции остается мало изученным.

Цель работы: исследовать неоднородность гемоглобинового профиля костного мозга после инициирования воспалительного процесса.

Материалы и методы

Исследования проводили на 50 крысах линии Вистар массой 250-300 г. Условия содержания и обращение с используемыми в эксперименте живот-

ными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС2010/63/EU).

Острое асептическое воспаление вызывали путем введения под кожу спины скипидара в количестве 0,5 мл под эфирным наркозом. Экспериментальных животных делили на 4 группы. Первая группа служила контролем. Забор материала у крыс 2-ой, 3-ей и 4-ой групп осуществляли спустя 6 ч, 2 и 4 сут после ведения скипидара. Животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза.

Проводили оценку следующих показателей: миелограмма, общий анализ крови, содержание ретикулоцитов и содержание эритроцитов с фетальными формами гемоглобина, соотношения белковых фракций гемоглобина костного мозга и периферической крови.

Для дифференцировки форменных элементов мазки костного мозга окрашивали красителем Романовского-Гимза. Типирование клеток проводили на 500 миелокариоцитов, используя объектив с масляной иммерсией и увеличением 100× на световом микроскопе Leica DM 250 (Германия). Для анализа периферической крови совершали забор крови из хвостовой вены крысы. Измерения образцов крови осуществляли с помощью геманализатора Celly 70 фирмы Biocode-Nucel (Франция). Для выявления ретикулоцитов производили окрашивание мазков крови бриллиантовым крезиловым синим. Для обнаружения эритроцитов, содержащих фетальные формы гемоглобина, мазки крови выдерживали в цитратно-фосфатном буфере (pH=4,5), затем в 1% растворе эозина. Подсчет числа ретикулоцитов и фетального гемоглобина осуществляли в мазках крови на 1000 клеток, используя объектив с масляной иммерсией и увеличением 100× на световом микроскопе Leica DM 250 (Германия). Для определения соотношения белковых фракций гемоглобина крови и костного мозга использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле по методу Г. Маурера (рисунок 1), [8].

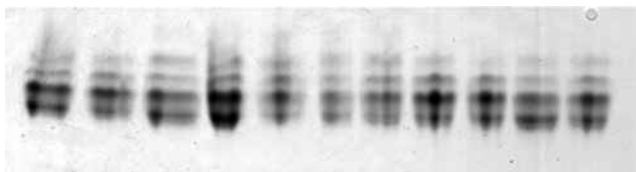


Рис. 1. Электрофореграмма костного мозга крыс. Окраска бензидином.

Статистическую обработку данных проводили с применением непараметрических методов статистики («Statistica 8.0»). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждения

После инициирования воспалительного процесса на 6 ч в миелограмме у крыс отмечается увеличение общего числа эритробластов, миелоцитов, ретикулярных клеток и мегакариоцитов. Возрастание числа эритробластов с увеличением числа ретикулярных клеток свидетельствует об активации эритропоэза на 6 ч после введения скипидара. На 2 сут после развития воспалительной реакции, число эритробластов и миелобластов значительно снижается, в сравнении с интактной группой. На 4 сут отмечается увеличение общего числа миелокариоцитов за счет увеличения клеток всех типов нейтрофильного и лимфоидного рядов. Наблюдается также снижение эритробластов и мегакариоцитов по сравнению с контролем (таблица 1).

Литературные данные свидетельствуют, что миелобласты (клетки-предшественницы гранулоцитов) и мегакарициты (предшественники тромбоцитов) являются неотъемлемыми участниками воспалительного процесса. Белые клетки крови, образовавшись в костном мозге, перемещаются в очаг воспаления. Тромбоциты, сформировавшись в цитоплазме мегакариоцитов, отшнуровываются в синусы костного мозга, а затем поступают в циркуляцию [9]. На 4 сут после острого асептического воспаления отмечается увеличение клеток нейтрофильного ряда в 2,5 раза в сравнении с интактной группой. Миелограмма свидетельствует о нарастающей в процессе воспаления гиперплазии гранулоцитарного ростка лимфоидной инфильтрации костного мозга.

При остром асептическом воспалении основные изменения затрагивают клетки гранулоцитарного ростка гемопоэза. Со стороны белой крови отмечается развитие нейтрофильного лейкоцитоза. Со стороны красной крови на 6 ч после введения скипидара существенных изменений не наблюдается. На 2 сут уменьшается общее содержание гемоглобина ($134,20 \pm 4,56$ г/л на 2 сут, $p < 0,05$, в контроле $147,40 \pm 3,10$ г/л) и число эритроцитов ($6,86 \pm 0,18$ М/уЛ на 2 сут, $p < 0,001$, в контроле $8,36 \pm 0,16$ М/уЛ). Отмечается ретикулоцитоз ($9,58 \pm 0,55\%$ на 2 сут, $p < 0,001$, в контроле $2,15 \pm 0,18\%$), что указывает на усиление эритропоэза. На 4 сут показатели крови приближаются к норме. Ретикулоцитоз сохраняется ($9,86 \pm 0,15\%$ на 4 сут, $p < 0,001$, в контроле — $2,15 \pm 0,18\%$). Количество эритроцитов, несущих фетальные формы гемоглобина достоверно не изменяется на данные сроки.

После введения скипидара на 6 ч гемоглобиновый профиль костного мозга характеризуется снижением доли гемоглобинов 1 и 2 белковых фракций за счёт увеличения содержания гемоглобинов 3 и 6 изоформ. На 2 сут после острого асептического воспаления уровень 4, 5 и 6 белковых фракций гемоглобина возрастает за счет снижения гемоглобина 1, 2 и 3 белковых фракций. На 4 сут после инициирования воспалительной реакции отмечается падение 2, 3 изоформ за счет роста — 4 и 5 фракций (таблица 2).

Таблица 1
Миелограмма крыс при остром асептическом воспалении
(млн/100 г массы тела)

Показатели	Интактная группа	Воспаление		
		6 ч	2 сут	4 сут
Общая клеточность	41,43±4,73	46,12±2,85	26,34±3,61*	68,72±2,15*
Эритробласты	2,85±0,33	4,15±0,52*	1,29±0,15*	1,05±0,02*
Базофильный нормоцит	2,102±0,18	3,54±0,11	2,10±0,33	1,96±0,11
Полихроматофильный нормоцит	1,52±0,11	1,5±0,10	1,75±0,24	1,59±0,52
Оксифильный нормоцит	0,81±0,12	0,83±0,05	1,46±0,07*	0,89±0,01
Эритроидный ряд	7,28±1,03	8,12±0,08	6,87±0,86	6,18±0,22
Миелобласты	4,85±0,52	5,01±0,12	1,86±0,19*	8,5±0,56*
Миелоциты	4,96±0,21	6,91±0,40*	7,64±0,18	3,57±0,18*
Нейтрофильный метамиелоцит	1,01±0,04	1,01±0,08	1,82±0,10	7,92±0,92*
Нейтрофилы (палочкоядерные/ сегментоядерные)	9,15±0,55	9,42±0,75	4,53±0,49*	27,51±1,93*
Нейтрофильный ряд	19,97±1,32	22,05±0,84	15,88±0,96*	45,69±2,14*
Эозинофильный ряд	0,901±0,15	0,66±0,15	0,79±0,09	0,61±0,02
Базофильный ряд	0,68±0,05	1,23±0,1*	0,96±0,08*	0,63±0,01
Моноцитарный ряд	1,74±0,35	2,41±0,03	1,92±0,11	2,01±0,24
Лимфоидный ряд	10,03±0,64	9,15±0,54	7,11±0,32*	12,25±0,50*
Мегакариоциты	0,512±0,11	1,37±0,19*	0,51± 0,18	0*
Ретикулярные клетки	0,33±0,08	1,04±0,25*	1,12± 0,38	1,18±0,40*

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы интактных животных ($p<0,05$).

Таблица 2
Фракции гемоглобина костного мозга крыс при остром
асептическом воспалении, %

№ п/п	Показатель	Интактная группа	Воспаление 6 ч	Воспаление 2 сут	Воспаление 4 сут
1.	1 фракция	10,218±0,293	4,340±0,087*	8,070±0,235*	9,866±0,24
2.	2 фракция	12,586±0,209	6,824±0,598*	8,066±0,573*	11,482±0,47*
3.	3 фракция	43,874±0,958	52,516±1,031*	35,980±0,532*	34,920±0,61*
4.	4 фракция	18,954±0,530	19,788±0,575	24,650±1,590*	26,656±1,23*
5.	5 фракция	9,064±0,563	8,552±0,839	11,740±0,609*	10,99±0,47*
6.	6 фракция	5,304±0,426	7,980±0,508*	11,494±1,088*	6,086±0,31

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы интактных животных ($p < 0,05$).

Гемоглобиновый профиль периферической крови при развитии воспалительной реакции на 6 ч после развития воспалительной реакции обусловлен снижением содержания 1 и 2 изоформы за счет увеличения количества гемоглобина 5 и 6 белковых фракций (таблица 3). Согласно предположению, выдвинутому Стародубом Н. Ф. [10], фракции 5 и 6 гемоглобина крыс являются физиологическим эквивалентом фетального гемоглобина человека, т.е. благодаря данным фракциям обеспечивается перенос большего количества кислорода к очагу воспаления.

На 2 сут после введения скипидара повышается содержание гемоглобина 4 белковой фракции за счёт уменьшения содержания гемоглобина 1, 2 и 6 фракций. На 4 сут после развития воспалительной реакции уменьшается содержание 3 изоформы. Однако, остальные белковые фракции достоверно не меняются (таблица 3).

Таблица 3
Фракции гемоглобина периферической крови крыс при остром
асептическом воспалении, %

№ п/п	Показатель	Интактная группа	Воспаление 6 ч	Воспаление 2 сут	Воспаление 4 сут
1.	1 фракция	8,702±0,186	7,434±0,342*	3,816±0,211*	8,720±0,23
2.	2 фракция	11,510±0,353	10,280±0,368*	5,592±0,154*	11,812±0,3
3.	3 фракция	42,860±0,655	40,202±1,118	44,194±0,315	41,28±0,41*
4.	4 фракция	20,126±0,445	19,836±0,815	32,830±0,840*	20,934±0,44
5.	5 фракция	9,314±0,149	10,672±0,316*	8,144±0,626	9,51±0,19
6.	6 фракция	7,448±0,856	11,576±1,120*	5,424±0,221*	7,744±0,14

Примечание: * — статистически значимые отличия от группы интактных животных ($p < 0,05$).

Заключение

Гемоглобиновый профиль костного мозга характеризуется возрастанием фракций с кислотоустойчивыми свойствами, что способствует наибольшему притоку не только нейтрофильных, но эритроидных клеток в очаг воспаления. Поступающие из костного мозга в периферическую кровь нейтрофилы мигрируют к очагу воспаления и участвуют в процессе антимикробной защиты организма. Увеличение числа ретикулярных клеток в костном мозге при воспалительной реакции свидетельствует об усилении эритропоэза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Потемина Т. Е., Ляляев С. В., Кузнецова С. В. Системные изменения в организме при воспалении. Хроническое воспаление: методика разработки для самостоятельной работы студентов медицинских вузов. Н. Новгород: изд-во НижГМА, 2010. 33 с.
2. Дыгай А.М., Шахов В.П. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза. Томск, 1989. 224 с.
3. Замышляева М. В. Патогенетические механизмы и сигнальные пути изменений агрегации эритроцитов и адгезии лейкоцитов при нарушении сосудистого тонуса и воспалении: автореферат на соискание уч. степени канд. мед. наук. / М. В. Замышляева: ЯрГПИ. Москва. 2007. 24 с.
4. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома / А.Н. Токушева, М.К. Балабекова, С.Е. Мырзагулова и др.// Современные проблемы науки и образования. №6. 2015. с. 273.
5. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017. № 1(68). С. 4–18. DOI: 10.5281/zenodo.345606
6. Сумин М.Н. Гетерогенная система гемоглобина в условиях нормального и измененного эритропоэза / Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Екатеринбург. 2002. 170 с.
7. Бриллиант С.А., Юшков Б.Г. Исследование гемоглобинового спектра костного мозга крыс при постгеморрагической анемии // Вестник уральской медицинской академической науки, 2018.Т. 15. №4. С.570-576. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-4-570-576
8. Maurer G. Disc-electrophoresis. Theory and practice of polyacrylamide gel electrophoresis. М. 1971. 271p.
9. Юшков Б. Г. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, М.В. Северин. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 203 с.
10. Стародуб Н. Ф. Гетерогенная система гемоглобина: структура, свой-

ства, синтез, биологическая роль / Н.Ф. Стародуб, В.И. Назаренко – Киев: Наук. Думка, 1987. 200 с.

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.